



反应器技术研究性综合实验设计与探索

贡向辉^{1,2,3}, 谢倍珍^{1,2,3}, 王江雪^{1,2,3}, 宋 巍^{1,2,3}, 樊瑜波^{1,2,3}

(1. 北京航空航天大学 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京 100083;

2. 北京航空航天大学 北京市生物医学工程高精尖创新中心, 北京 100083;

3. 北京航空航天大学 生物与医学工程学院, 北京 100083)

摘要: 基于培养学生创新精神和实践能力的需求, 结合科研实践, 设计了具有研究性和开放性的综合教学实验, 并进行了教学探索。该教学实验项目探究培养模式对动物细胞生长代谢的影响。实验涵盖动物细胞培养模式、细胞生长和代谢动力学参数检测分析等多个环节, 综合训练学生生物反应动力学、仪器分析、数据分析等多方面的知识和技能, 并且培养学生利用实验数据进行反应器设计的拓展和创新能力。在类似于现实科研工作的场景中, 激发学生的科技创新兴趣、培养学生的科技创新能力、实践能力和工程意识。

关键词: 实验教学; 研究性综合实验; 生物反应器; 动物细胞; 批培养; 补料分批培养

中图分类号: C45

文献标志码: A

DOI: [10.12179/1672-4550.20220280](https://doi.org/10.12179/1672-4550.20220280)

Design and Exploration of Research-oriented and Comprehensive Experiment on Teaching of Bioreactor Technology Course

GONG Xianghui^{1,2,3}, XIE Beizhen^{1,2,3}, WANG Jiangxue^{1,2,3}, SONG Wei^{1,2,3}, FAN Yubo^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of Biomechanics and Mechanobiology, Ministry of Education, Beihang University, Beijing 100083, China;

2. Beijing Advanced Innovation Center for Biomedical Engineering, Beihang University, Beijing 100083, China;

3. School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100083, China)

Abstract: Based on the training requirements of innovative and practical ability of students, a research-oriented and comprehensive experiment has been designed and explored in teaching of bioreactor technology course. This experiment focuses on effects of culture model on growth and metabolism of animal cells. This experiment includes experimental units of culture model, kinetics of cell growth and metabolism, and parameter measurements, covers the knowledge and ability training of kinetics of biological reaction, instrumental analysis, data analysis and processing as well. And it cultivates students' ability to expand and innovate in using experimental data for bioreactor design. Through the teaching design and exploration by teachers, students' enthusiasm for research and innovation were inspired, and students' innovative ability and engineering ideas were cultivated in a simulated research-oriented environment in this experiment.

Key words: experimental teaching; research-oriented and comprehensive experiment; bioreactor; animal cell; batch culture; fed-batch culture

顺应国家和社会的发展, 培养具有创新精神和实践能力的人才, 是我国高等教育人才培养的一个核心目标^[1-2]。因此, 依据创新的特点和创新所遵循的规律引导学生构建创新活动所必须具备的知识和能力体系是高校本科教育的一个重要任务。

反应器技术是生物技术和生物医学工程专业

本科生的专业课, 对疫苗、抗体、抗生素等国家战略新兴产业专业人才培养极其重要^[3-6]。本课程以生物反应器为主要研究对象, 以生物反应过程研究为基础, 以反应器的设计、开发为目标, 帮助学生构建反应器技术基本知识和理论体系、培养学生利用反应器技术理论解决科研和工业生产问题的能力。要达成本课程教学目标, 必须采取

收稿日期: 2022-05-13; 修回日期: 2022-08-03

基金项目: 北京航空航天大学本科生教改项目(202012)。

作者简介: 贡向辉(1972-), 女, 博士, 副教授, 主要从事生物医学工程方面的研究。E-mail: xhgong@buaa.edu.cn

有效措施培养学生分析问题、解决问题的能力,创新思想和工程意识^[4,7-8]。

实验教学是连接知识、实践和创新的重要桥梁,它帮助学生验证理论知识、形成科学概念、认识科学规律、掌握科学方法^[9-12]。实验教学改革的成果表明:当实验教学与科研有机结合时,有利于激发学生的学习积极性,开拓他们的视野,培养他们的创新意识和实践能力^[13-15]。目前本科反应器技术课程的实验教学侧重于传统的微生物培养,体现科研和产业热点、前沿的动物细胞反应器相关内容较少;实验项目多为验证性实验,缺乏综合性、探究性和开放性的实验项目。这些问题不利于学生借助实验环节建立反应器技术基本理论、设计优化方法和科研生产实践之间的联系,不利于学生创新意识与综合能力的培养。

为解决上述问题,按照反应器技术的学科特点,结合教学团队的科研和教学工作,选择更贴近科研生产热点和前沿的动物细胞反应器(用于疫苗、抗体、再生医学等领域),针对其设计和优化的关键环节,设计了具有研究性和开放性的综合实验任务,帮助学生深入理解细胞生长代谢特征、操作模式与反应器设计及优化重要参数之间的关系,并进行了教学实践探索。

1 实验设计

1.1 教学实验项目总体设计

为解决目前课程教学中缺少动物细胞反应器相关的综合性实验的问题,以科研和生产中的主流培养模式——批培养(batch culture)和补料分批培养(fed-batch culture)为模型,设计了培养模式对动物细胞生长代谢影响的综合实验项目。生物反应器是生物反应过程的核心设备,生物反应器内存在着复杂的细胞生长代谢过程和物理现象之间的相互作用,不同的生物反应器操作模式(培养模式)表现出不同的动力学特性和反应结果,这构成了生物反应器的基本特性和设计放大的基础。细胞量、细胞活率、葡萄糖和乳酸是培养过程中要控制的重要参数,也是反应器操作、设计、优化中必须要考虑的参数。本实验项目涵盖动物细胞传代培养、批培养、补料分批培养、细胞数量和细胞活性检测、细胞主要代谢物(葡萄糖、乳酸)检测、细胞生长动力学、代谢动力学参数分析 7 个环节,帮助学生建立和深化对细胞生长代谢特

征、培养模式、反应器设计与优化参数的认识,综合训练学生生物反应动力学、仪器分析、数据分析等方面的实验技能。

实验教学中采用问题导向的教学模式,对学生提出“培养模式对细胞生长和代谢有什么影响?如何运用反应器技术实现培养过程的优化?”这两个科学问题,让学生根据自己的需求设计实验,自行组织实验实施,记录并分析数据,教师及时给予引导和帮助。

1.2 实验目的

1) 训练文献检索和加工整理的能力,理解细胞培养模式与细胞代谢规律在反应器设计和优化中的作用。

2) 熟悉动物细胞批培养、补料分批培养的培养模式,熟悉这些培养模式下细胞生长、代谢规律和重要参数的分析方法。

3) 掌握动物细胞培养技术,掌握酶标仪、倒置显微镜、高压灭菌器等设备的使用,掌握细胞活率、葡萄糖、乳酸检测方法。

1.3 实验仪器与材料

1.3.1 仪器

细胞培养箱、多功能酶标仪(Thermo Scientific, 美国);高速冷冻离心机(Hermle, 德国);超净工作台(苏州净化设备有限公司, 中国);倒置显微镜(Olympus, 日本);血球计数板(上海求精, 中国);高压灭菌器(ALP, 日本)。

1.3.2 材料

K562 种子细胞(由北京航空航天大学生物医学工程学院易宗春教授惠赠);胎牛血清(北京元亨金马生物技术有限公司, 中国);RPMI 1640 细胞培养基(Gibco, 美国);台盼蓝(上海生工, 中国);葡萄糖测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国);乳酸测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 中国);100 mm 细胞培养皿(杭州生友生物技术公司, 中国);125 mL 玻璃细胞培养瓶(四川蜀玻, 中国)。

1.4 实验流程与方法

1.4.1 实验流程

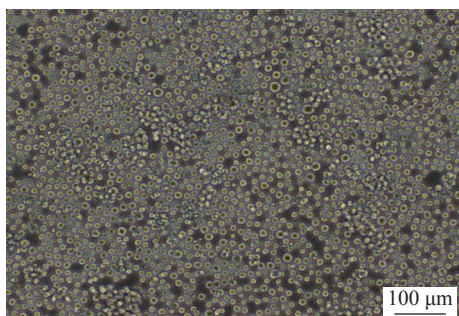
1) 细胞培养与传代

K562 种子细胞复苏后放入 100 mm 细胞培养皿中,加入完全培养基(含 10% FBS 的 RPMI 1640 细胞培养基),在 37 ℃、含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。培养 3 天后进行传代:将细胞培养液连同

细胞一起转移到 15 mL 无菌离心管中, 取样并进行细胞计数; 细胞悬液在 4 ℃、1000 r/min 条件下离心 5 min, 弃去上清, 用新鲜完全培养基重悬, 按照 4×10^5 cells/mL 的细胞密度接种到新的培养皿中培养。

2) 细胞的批培养与补料分批培养

细胞批培养: 如图 1(a)所示, K562 细胞以 4×10^5 cells/mL 的细胞密度接种到 125 mL 的瓶中, 细胞培养液体积为 30 mL, 在 37 ℃、含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 如图 1(b)所示。每天同一时间取样 0.5 mL 进行细胞计数, 并计算细胞活率。剩余样品在 4 ℃、1000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清, -20 ℃ 冻存, 用于葡萄糖、乳酸浓度检测。



(a) 实验中使用的 K562 细胞



(b) 培养装置, 包含玻璃瓶和细胞培养箱

图1 反应器技术综合创新实验的培养系统

细胞补料分批培养: K562 细胞以 4×10^5 cells/mL 的细胞密度接种到 125 mL 的瓶中, 细胞培养液体积为 30 mL, 在 37 ℃、含 5% CO₂ 细胞培养箱中培养。每天同一时间取样 2.5 mL, 细胞培养 2 天后, 在取样后加入 2.5 mL 新鲜的完全培养基, 使培养体系的总体积保持不变。取出的样品进行细胞计数, 并计算细胞活率。剩余样品在 4 ℃、1000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清, -20 ℃ 冻存, 用于葡萄糖、乳酸浓度检测。

1.4.2 分析检测方法

1) 细胞计数与细胞活率检测

在血球计数板上点样 (10 μL 待测细胞悬液/计

数模块), 用台盼蓝拒染法对细胞进行计数并确定细胞的存活率, 每个样本计数 3 次, 取平均值。

2) 葡萄糖浓度检测

样本解冻后混匀, 按照葡萄糖测定试剂盒的说明, 用葡萄糖氧化酶法测定样本的葡萄糖浓度。

3) 乳酸浓度检测

样本解冻后混匀, 用 PBS 稀释 5 倍, 按照乳酸测定试剂盒的说明, 用乳酸脱氢酶法测定样本的乳酸浓度。

4) 细胞代谢参数的计算

计算细胞的比生长速率 μ 和乳酸的比生成速率 Q_{Lac} 分别为:

$$\mu = \frac{dx}{xdt} \quad (1)$$

$$Q_{Lac} = \frac{dC_{Lac}}{xdt} \quad (2)$$

1.5 结果与分析

1.5.1 细胞生长分析

1) 细胞生长

在批培养模式下, 细胞经历了迟滞期、对数生长期、维持期和死亡期: 活细胞量和总细胞量在接种的第 1 天缓慢增加, 在第 2 天开始快速增长, 至第 4 天达到峰值, 此时的活细胞量和总细胞量分别为 10×10^5 cells/mL 和 11×10^5 cells/mL。此后活细胞量快速下降, 在培养的第 6 天活细胞量为 6×10^5 cells/mL, 培养终止, 如图 2(a) 所示。

在补料分批培养的培养模式下, 于培养的第 2 天取样后开始补料, 补料开始后细胞生长表现出与批培养不同的趋势: 活细胞量和总细胞量的增长均高于批培养, 在培养的第 5 天活细胞量和总细胞量分别达到峰值, 为 17×10^5 cells/mL 和 18×10^5 cells/mL。与之相对应的是: 补料分批培养模式下, 细胞在快速增长期的比生长速率平均值为 0.57 d^{-1} , 高于批培养的 0.51 d^{-1} 。补料分批培养模式下, 细胞维持快速增长的时间比批培养模式长 1 天, 如图 2(b) 所示。在补料分批培养模式下细胞量达到高峰后, 活细胞量下降幅度小于批培养, 到培养的第 8 天, 活细胞量降为 8×10^5 cells/mL, 培养结束。

2) 细胞活率

在批培养模式的第 1~4 天细胞维持良好的活率, 在细胞量达到高峰时 (day4) 细胞活率为

91.37%，此后细胞活率快速下降，在培养的第 6 天细胞活率降为 42.86%，如图 3 所示。

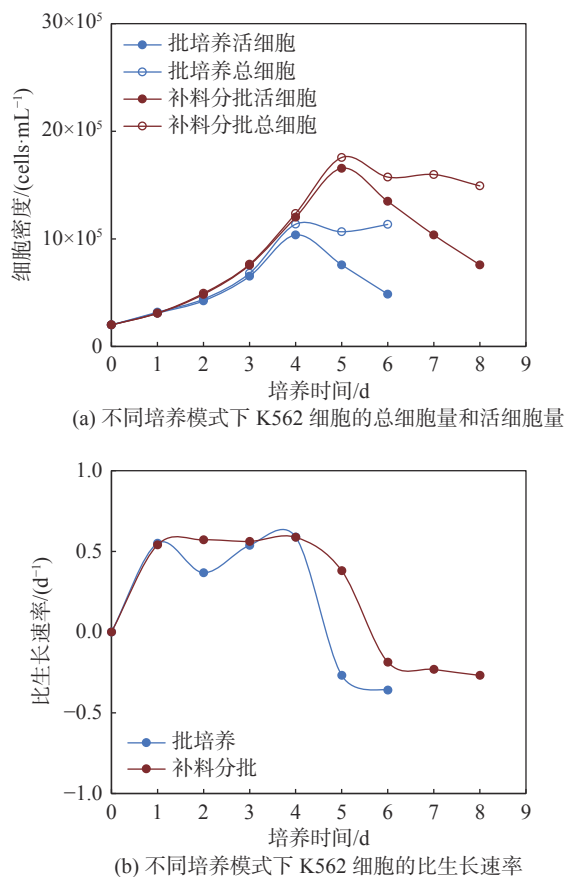


图 2 不同培养模式下 K562 细胞的细胞量和比生长速率

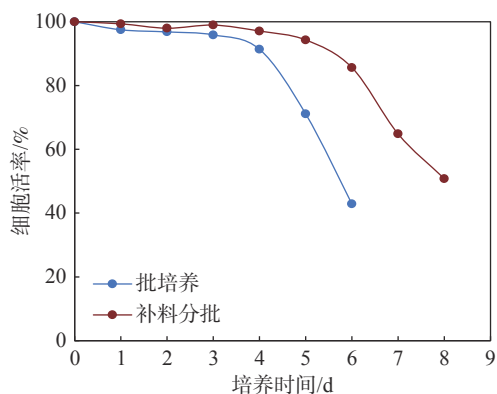


图 3 不同培养模式下 K562 细胞的细胞活率

补料分批培养的整个培养过程中，细胞活率高于批培养，在培养的第 5 天细胞量达到高峰时，细胞活率为 94.31%，此后细胞活率下降，下降幅度明显小于批培养，到培养的第 8 天，细胞活率降为 50.80%，如图 3 所示。

1.5.2 细胞代谢分析

1) 葡萄糖代谢

在批培养和补料分批培养的起始阶段(day1~

day2)葡萄糖浓度具有相同的变化趋势，但是开始补料后两者的变化趋势表现出明显的差异，批培养模式下葡萄糖浓度继续下降，到培养的第 6 天葡萄糖浓度从 25 mmol/L 降低到 1.95 mmol/L，而补料分批培养模式下葡萄糖浓度稳定维持在 6.82~8.02 mmol/L 的较窄范围内，如图 4(a)所示，表明补料分批培养模式下细胞的营养状态明显好于批培养模式。

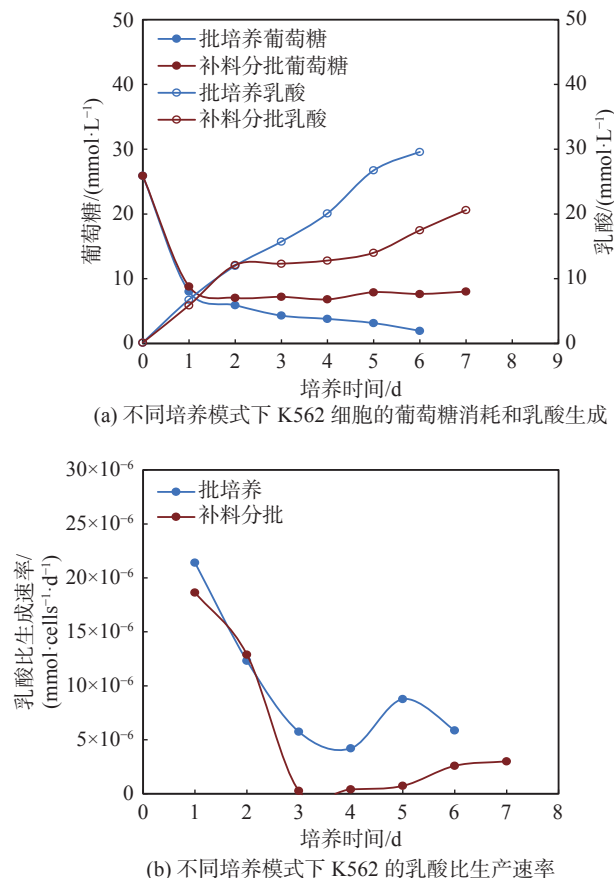


图 4 不同培养模式下 K562 细胞的代谢分析

2) 乳酸代谢

与葡萄糖代谢情况类似，在批培养和补料分批培养的起始阶段(day1~day2)乳酸浓度具有相同的变化趋势，但是开始补料后两者的变化趋势表现出明显的差异，批培养模式的乳酸浓度继续快速上升(11.99 mmol/L, day2; 15.73 mmol/L, day3; 20.09 mmol/L, day4; 26.73 mmol/L, day5; 29.58 mmol/L, day6)，而补料分批培养模式下 day2~day5 乳酸浓度稳定维持在 12.12~14.01 mmol/L 的范围内，此后乳酸浓度缓慢升高，到第 7 天达到 20.60 mmol/L，如图 4(a)所示。与之相对应的是：补料分批培养模式下，补料开始后乳酸的比生成速率平均值接近 0，显著低于批培养，如图 4(b)所示。

1.6 思考与拓展

细胞量和细胞活率是培养过程中的重要参数,也是反应器设计和优化中必须考虑的因素^[16]。在实验教学中,引导学生仔细观察不同培养模式下细胞生长和细胞活率特征,通过数据分析发现不同时期细胞生长和活率的规律,增加学生对培养过程和培养模式的感性认识,培养学生发现实验现象背后的科学规律的能力。

葡萄糖和乳酸代谢是培养过程中需要控制的最重要的代谢参数,不同的培养模式下,细胞的葡萄糖和乳酸代谢水平有显著差异,直接决定培养过程的活细胞量和产物水平^[10,16]。在实验教学中,引导学生通过实验发现不同培养模式下葡萄糖消耗及乳酸产生规律,深入理解不同培养模式对反应器选型和设计的重要影响,进一步思考如何利用实验研究获取用于反应器设计和优化的关键参数,利用获得的数据进行反应器选型、设计、优化的拓展。

2 实验教学探索

2.1 实验教学的组织实施

经过两轮教学探索,建立了组织实施教学实验项目的整体流程,如图5所示。

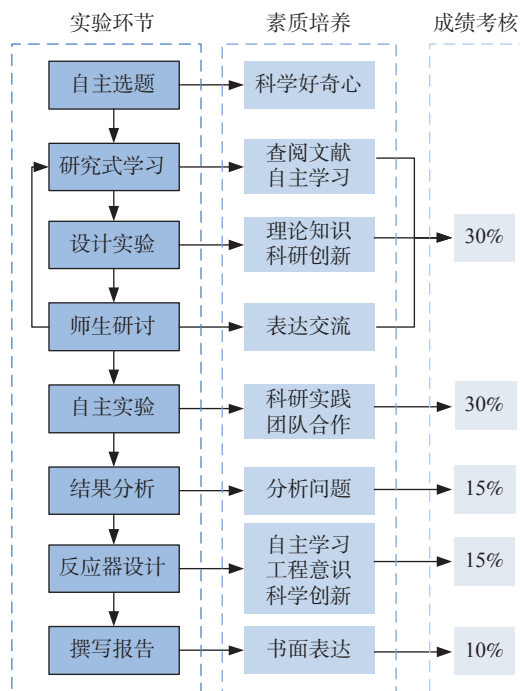


图5 实验教学实施流程

在实验教学中注意强调学生的主体地位和教师的指导作用:学生作为主体,自由组队、自主选题、自主探索并完成自己设计的实验;教师起指导作用,引导学生创新思考、大胆探索、动手

实践、实现对学生科学素养和能力的培养。具体而言,教师在实验教学中引导学生通过实验研究,从反应器设计和优化角度深入理解不同培养模式对细胞生长代谢的影响,思考如何利用实验研究获取用于反应器设计和优化的关键参数,如何利用获得的数据进行反应器选型、设计、优化。鼓励学生从新的角度设计实验,使实验内容更丰富,实验教学形式更灵活,更有利于满足不同层次的学生参与创新型实验的需求。学生在实验过程中自行组合,分工协作,完成一个内容相对完整的实验研究项目,此过程培养了学生的合作能力和团队精神。学生进行数据分析,并在课堂与老师和同学讨论,此过程培养了学生分析判断、逻辑推理、数据归纳的能力。

实验项目完成后,要求学生基于本实验获得的数据自行查阅文献,自主完成适用于K562细胞的动物细胞反应器,使本实验进一步拓展,强化学生的工程实践能力。

选择教学过程中的关键节点,从多个学习过程和学习维度考核学生的学习能力,提高学生的学习主动性。

2.2 教学实践效果

在实验教学中,学生普遍反映实验课有助于他们将所学的理论知识回归到实际应用中,既有趣又实用。教学效果调查反映出本研究性综合性实验项目有助于激发学生的求知欲望,并将求知欲望转化为学习动力,完成从“现实问题”到“科学本质”的升华。

3 结束语

本研究性综合性实验项目为增强学生在反应器技术理论学习与科研实践的有效联系,提升学生的创新能力和工程意识而开设。实验培养学生综合运用反应器技术基本知识和理论解决问题的能力,包括设计和实施实验、分析实验数据、利用实验数据设计反应器等。通过实验课设计及教师在实验教学中的引导,在类似于现实科研工作的场景中,激发学生的科技创新兴趣、培养学生的科技创新能力和工程意识,为学生日后的学习和工作打下良好的基础。

参考文献

- [1] 王晓红,李玉刚,田文德,等.基于拔尖创新型人才培养模式的新型化工课程群建设[J].化工高等教育,2018,

- 35(1): 43–46.
- [2] 陈杭, 周泓, 沈义民, 等. 生物医学工程创新教育模式实践探索[J]. 教育教学论坛, 2020(23): 251–252.
- [3] 王启要, 高淑红, 白云鹏, 等. 面向生物医药新工科方向的生物工程一流本科专业建设探索与实践[J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1227–1236.
- [4] 程易, 颜彬航, 卢滇楠. 反应工程基础教学的实施及“后疫情”时代教学的思考[J]. 化工高等教育, 2021, 38(1): 3–9.
- [5] GALLO-RAMIREZ L E, NIKOLAY A, GENZEL Y, et al. Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production[J]. Expert Review of Vaccines, 2015, 14(9): 1181–1195.
- [6] JYOTHILEKSHMI I, JAYAPRAKASH N S. Trends in monoclonal antibody production using various bioreactor syst[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2021, 31(3): 349–357.
- [7] HESHOF R, VISSCHER B, PRÖMEL S, et al. Large-scale cultivation of *Caenorhabditis elegans* in a bioreactor using a labor-friendly fed-batch approach[J]. BioTechniques, 2019, 67(1): 33–39.
- [8] 张良俭, 张蕴贤. 化学反应工程课程的逻辑结构及工程思维方式[J]. 浙江科技学院学报, 2016, 28(5): 401–408.
- [9] 钱炜鑫, 张锐, 曹发海, 等. 反应动力学贯穿的化学反应工程教学思路及教学案例[J]. 化工高等教育, 2013, 30(6): 39–43.
- [10] XING Z, KENTY BM, LI ZJ, et al. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 103(4): 733–746.
- [11] 徐宁, 王玫, 吴倩. “精品实验项目”建设重在诠释经典和方法创新[J]. 实验室研究与探索, 2013, 32(2): 112–115.
- [12] 朱玉华, 杨正宏. 建设精品实验项目 促进创新能力培养[J]. 实验室研究与探索, 2008, 27(1): 7–9.
- [13] 华铁丹. 基于图像处理的物料识别综合实验设计[J]. 实验科学与技术, 2022, 20(5): 140–145.
- [14] 李树娜. 研究型化工综合教学实验设计与探索[J]. 实验室研究与探索, 2018, 37(9): 181–184.
- [15] 王英, 杨坤涛, 骆清铭, 等. 将学科发展成果转化为实践教学资源的探索[J]. 实验室研究与探索, 2010, 29(5): 126–129.
- [16] GONG X, LI D, LI X, et al. Fed-batch culture optimization of a growth-associated hybridoma cell line in chemically defined protein-free media[J]. Cytotechnology, 2006, 52(1): 25–38.

编辑 张莉

(上接第 6 页)

- [6] CHEN W Q. Radio frequency identification technology and applications[EB/OL]. [2021–10–01]. <https://urn.fi/URN:NBN:fi:amk-2015062413690>.
- [7] LI C, MO L, ZHANG D. Review on UHF RFID localization methods[J]. IEEE Journal of Radio Frequency Identification, 2019, 3(4): 205–215.
- [8] HADDARA M, STAABY A. RFID applications and adoptions in healthcare: a review on patient safety[J]. Procedia Computer Science, 2018, 138: 80–88.
- [9] 韩业飞, 侯伟, 王军, 等. 基于RFID的人员精确定位方法分析[J]. 电子技术与软件工程, 2018(24): 80.
- [10] 徐小龙. 物联网室内定位技术[M]. 北京: 电子工业出版社, 2017.
- [11] XIANG Z, SONG S, CHEN J, et al. A wireless LAN-based indoor positioning technology[J]. IBM Journal of Research and Development, 2004, 48(5-6): 617–626.
- [12] ZHOU G, YUE M, YANG X, et al. A metal interference correction method of tunnel transient electromagnetic advanced detection[J]. Journal of Geophysics and Engineering, 2020, 17(3): 429–438.
- [13] SADOWSKI S, SPACHOS P. Rssi-based indoor localization with the internet of things[J]. IEEE Access, 2018(6): 30149–30161.
- [14] LIM T S, SIM S C, MANSOR M M. RFID based attendance system[C]//2009 IEEE Symposium on Industrial Electronics & Applications. [S. l.]: IEEE, 2009.
- [15] 史文进. 基于RSSI无线传感网络室内定位算法研究[D]. 重庆: 重庆理工大学, 2018.
- [16] CUI X, WANG M, LI J, et al. Indoor wi-fi positioning algorithm based on location fingerprint[J]. Mobile Networks and Applications, 2021, 26(1): 146–155.
- [17] XU X, TANG Y, WANG X, et al. Variance-based fingerprint distance adjustment algorithm for indoor localization[J]. Journal of Systems Engineering and Electronics, 2015, 26(6): 1191–1201.

编辑 张俊